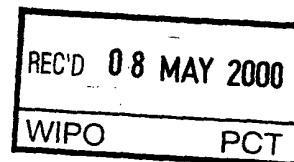




PCT/FR 00 / 00 67 6

EJU #2

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 18 AVR. 2000**DOCUMENT DE
PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA REGLE
17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **19 03 99**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **99 03433**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**
DATE DE DÉPÔT **19 MARS 1999**

**1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

**CABINET ORES
6 Avenue de Messine
75008 PARIS**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

CMG1020/8FR

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES STABILISES COMME PRINCIPE ACTIF ANTITUMORAL

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

1) ASSISTANCE PUBLIQUE-HOPITAUX DE PARIS

2) UNIVERSITE Pierre et Marie CURIE-PARIS VI

3) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

Forme juridique

Nationalité (s) **1) 2) 3) française**

Adresse (s) complète (s)

Pays

1) 3, avenue Victoria, 75004 PARIS RP

FRANCE

2) 4, place Jussieu, 75252 PARIS Cédex 05

FRANCE

3) 101, rue de Tolbiac, 75654 PARIS Cédex 13

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

Béatrice ORES (n° 92-4046)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235°02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W /260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BLOjp1020/8FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 03433	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES STABILISES COMME PRINCIPE ACTIF ANTITUMORAL			
LE(S) DEMANDEUR(S) : ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE-PARIS VI INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		CARPENTIER	
Prénoms		Antoine	
Adresse	Rue	28 avenue Bosquet	
	Code postal et ville	75007	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (N m et qualité du signataire) Le 24 mars 2000 Béatrice ORES n° 92-4046			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

[illegible]

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées).

La présente invention se rapporte à l'utilisation d'oligonucléotides stabilisés comme principe actif antitumoral à action locale.

Le traitement efficace des cancers reste l'un des défis majeurs de la médecine d'aujourd'hui.

L'efficacité des thérapeutiques conventionnelles chirurgicales ou à visée cytolytique (chimiothérapie et radiothérapie) reste très limitée dans de nombreux cancers.

Pour les astrocytomes par exemple, dont le traitement repose principalement sur l'exérèse chirurgicale et l'irradiation cérébrale locale, la médiane de survie est seulement de 4 à 6 mois après exérèse chirurgicale et de 8 à 10 mois avec l'association chirurgie et radiothérapie. Une chimiothérapie complémentaire allonge la survie chez les patients de moins de 60 ans, mais de façon très modeste, de l'ordre de 3 mois. Sous ce triple traitement, la médiane de survie reste inférieure à deux ans pour le grade histologique III (astrocytome anaplasique) et inférieure à 1 an pour le grade IV (glioblastome). La mortalité pour ces deux groupes est de 100% (Daumas-Duport C. et al. (1988), *Cancer* 62(10) pp 2152-65).

La stimulation du système immunitaire général dans le traitement des cancers est une idée ancienne et de très nombreux produits ont été testés, comme par exemple les extraits bactériens (Jaeckle K. A. et al. (1990), *J. Clin. Oncol.* 8(8) pp 1408-18), l'ADN bactérien, notamment celui de *Mycobacterium bovis* (MY-1) (Tokunaga T. et al. (1984), *JNCI* 72 pp 955-62). MY-1 est cependant inefficace pour augmenter la survie dans un modèle de gliome chez la souris (Nakaichi M. et al. (1995), *J. Vet. Med. Sci.* 57(3) pp 583-5). L'IL2 (Herrlinger U. et al. (1996), *J. Neurooncol.* 27(3) pp 193-203) et plus récemment l'IL12 (Kishima H. et al. (1998), *Br. J. Cancer* 78(4) pp 446-53 ;

Jean W. C. et al. (1998), *Neurosurgery* 42(4) pp 850-6) ont également été étudiés.

Malheureusement, la plupart de ces produits ont une efficacité limitée ou une toxicité inacceptable et à ce jour, seul le BCG de *Mycobacterium bovis* a abouti à des applications cliniques, mais seulement dans des indications très limitées de cancers de la vessie (Soloway M. S. et al. (1988), *Urol. Clin. North Am.* 15 pp 661-9)

Les oligonucléotides sont constitués d'une succession de bases puriques ou pyrimidiques variables, choisies afin d'être complémentaires d'un gène donné. Injectés chez l'animal, les oligodésoxynucléotides pénètrent dans les cellules et en se combinant spécifiquement avec l'ARN messager ou l'ADN génomique correspondant, ils inhibent l'expression du gène correspondant. C'est ce qu'on appelle des oligodésoxynucléotides antisens.

En fait, il a été récemment montré que les oligodésoxynucléotides synthétiques possédaient parfois des effets biologiques propres, en dehors de leurs propriétés antisens classiques.

Certains oligodésoxynucléotides, indépendamment de toute séquence antisens connues, stimulent, *in vitro* et *in vivo*, la prolifération des lymphocytes B, l'activité des cellules NK et induisent la sécrétion par ces cellules d'IFN α , d'IFN β , d'IFN γ , d'IL6, d'IL12 ou de TNF α (Yamamoto S. et al. (1992), *J. Immunol.* 148(12) pp 4072-6 ; Yamamoto T. et al. (1994), *Microbiol. Immunol.* 38(10), pp 831-6 ; Yi A. K. et al. (1996), *J. Immunol.* 157(12) pp 5394-402 ; Ballas Z. K. et al. (1996), *J. Immunol.* 157(5) pp 1840-5 ; Cowdery J. S. et al. (1996), *J. Immunol.* 156(12) pp 4570-5 ; Stacey K. J. et al. (1996), *J. Immunol.* 157(5) pp 2116-22). L'ensemble de ces cytokines oriente vers une réponse immunitaire de type Th1 (Chu R.S. et al. (1997), *J. Exp. Med.* 186(10) pp 1623-31).

Des auteurs ont montré que les propriétés immunostimulantes de ces oligodésoxynucléotides sont en grande partie dépendantes de motifs 5'-CG-3' non méthylés (dinucléotides CpG non méthylés) qui sont sous-représentés dans l'ADN de mammifères (Kuramoto E. et al. (1992), *Jpn. J. Cancer Res.*, 83 pp 1128-31).

Si la séquence 5'-CG-3' non méthylée est indispensable, les deux nucléotides adjacents sont également cruciaux pour l'activité biologique optimale puisque certains auteurs ont montré que les hexamères les plus efficaces semblent être ceux du type 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3' (Krieg A. M. et al. (1996), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6(2) pp 133-9).

Récemment dans la demande internationale WO 9855495, Schwartz D. et al. ont montré, que tous les hexamères tels que définis par Krieg A. M. et al. (déjà cité) n'étaient pas immunostimulants et qu'il convenait plutôt de définir des octamères, de séquence 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-CC-3' ou de séquence 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-CG-3', pour avoir de manière certaine une activité immunostimulante.

Les oligonucléotides sont des polymères formés par la combinaison de bases et de sucres, notamment des ribonucléotides ou des désoxyribonucléotides. A l'état naturel, les liaisons sont des liaisons phosphoesters sensibles aux nucléases de l'organisme humain. Ainsi les oligonucléotides présentent une demi-vie très courte (de l'ordre de la minute) quand ils sont injectés chez l'homme, ce qui limitent leurs effets biologiques.

Aussi plusieurs études ont cherché à stabiliser les oligonucléotides en modifiant leur structure chimique pour les rendre résistants aux nucléases. Plusieurs types d'oligonucléotides stabilisés ont ainsi été créés comme, entre autres, les

phosphorothioates ou les méthylphosphonates, (Crooke R. M. (1991), *Anti-Cancer Drug Design* 6 pp 609-46). Les plus fréquemment utilisés sont les oligonucléotides phosphorothioates.

5 Les propriétés des oligonucléotides immunostimulants font actuellement l'objet de recherches pour déterminer leur intérêt comme adjuvant de certains vaccins anti-infectieux, comme l'hépatite B (par exemple Davis H. L. et al. (1998), *The Journal of Immunology* 10 160(2) pp 870-6).

En cancérologie, ils sont utilisés principalement pour stimuler l'immunisation dirigée contre un antigène tumoral spécifique. Ainsi deux études rapportent des effets antitumoraux, obtenus dans un modèle 15 de lymphome murin, lorsque des oligodésoxynucléotides immunostimulants sont utilisés à distance comme adjuvants, une partie de l'immunoglobuline des cellules lymphomateuses étant utilisée comme antigène. (Weiner G. J. et al. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, pp 10833-7 ; 20 Wooldridge J. E. et al. (1997) *Blood* 89(8) pp 2994-8).

Cependant la réalisation de tels vaccins chez l'homme se heurte à des problèmes techniques considérables, principalement en raison de la difficulté qui existe à déterminer un antigène cible potentiel face à 25 un cancer donné chez un malade donné.

Alors que les deux études rapportées par Weiner G. J. et al. et par Wooldridge J.E. et al. (déjà cités) montrent que les oligodésoxynucléotides, lorsqu'ils sont utilisés seuls, ne possèdent aucun effet antitumoral 30 et que la demande WO 98/55495 divulgue l'utilisation d'oligonucléotides comme adjuvant destiné à stimuler une immunité contre un antigène spécifique, quelque soit le site d'injection, les Inventeurs ont montré, de manière surprenante, dans un modèle syngénique de gliome de rat et 35 dans un modèle syngénique de neuroblastome de souris, que

l'injection d'oligonucléotides stabilisés, seuls, sans antigène associé, en particulier lorsque l'injection est faite dans la tumeur elle-même, a des effets antitumoraux remarquables.

5 De plus les Inventeurs ont montré que cet effet est lié d'une part à la présence d'une séquence particulière et d'autre part à la stabilisation des liaisons phosphates entre les bases et les sucres formant ces oligonucléotides.

10 En conséquence, les Inventeurs se sont donnés pour but d'utiliser certains oligonucléotides stabilisés, comme principe actif antitumoral à action locale.

Ainsi la présente invention a pour objet, l'utilisation d'oligonucléotides stabilisés qui
15 comprennent au moins une séquence hexamérique du type :
5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3' pour la préparation d'un médicament à action antitumorale locale.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'oligonucléotides stabilisés qui
20 comprennent au moins une séquence octamérique du type :
5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-CG-3' ou
5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-CC-3' comme principe actif antitumoral à action locale.

Dans un mode de réalisation préféré de
25 l'invention les oligonucléotides stabilisés utilisés comprennent au moins une séquence hexamérique choisie dans le groupe constitué par : AACGTT, GACGTT, AGCGTT, GGCGTT, AACGTC, GACGTC, AGCGTC, GGCGTC.

Dans un mode encore plus préféré de
30 réalisation de l'invention, les oligonucléotides stabilisés utilisés comprennent au moins une séquence choisie dans le groupe constitué par : AACGTTCC, GACGTTCC, AGCGTTCC, GGCGTTCC, AACGTTCCG, GACGTTCCG, AGCGTTCCG, GGCGTTCCG, AACGTCCC, GACGTCCC, AGCGTCCC, GGCGTCCC,
35 AACGTTCCG, GACGTTCCG, AGCGTTCCG, GGCGTTCCG.

Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'une au moins des bases des hexamères et des octamères décrits ci-dessus peut être modifiée, notamment l'une au moins des cytosines peut être
5 remplacée par une 5-bromocytosine.

Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'oligonucléotide stabilisé utilisé est choisi dans le groupe constitué par les séquences :

SEQ ID N° 1 : 5'-TGACCGTGAACGTTTCGAGATGA-3'

10 SEQ ID N° 2 : 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'

SEQ ID N° 3 : 5'-TCATCTCGAACGTTCCACAGTCA-3'

SEQ ID N° 4 : 5'-TGACTGTGAACGTTCCAGATGA-3'

SEQ ID N° 5 : 5'-TCCATAACGTTTCGCCTAACGTTTCGTC-3'

SEQ ID N° 6 : 5'-TGCCAGTGACGTCATGTGAC-3'

15 Conformément à l'invention, les oligonucléotides stabilisés utilisés sont sélectionnés notamment dans le groupe constitué par les oligonucléotides phosphorothioates, les oligonucléotides méthylphosphonates ou les oligonucléotides dont au moins
20 une extrémité a été stabilisée (Crooke R. M. (1991), *AntiCancer.Drug Design*, 6 pp 609-46). De préférence les oligonucléotides stabilisés utilisés selon la présente invention sont des phosphorothioates.

Conformément à l'invention, les
25 oligonucléotides stabilisés peuvent être utilisés sous forme de simple brin ou de double brin.

Pour l'utilisation conformément à l'invention, les oligonucléotides stabilisés peuvent avoir n'importe quelle longueur supérieure à 6 bases ou 6 paires de
30 bases, de préférence plus de 20 bases ou de 20 paires de bases.

Conformément à la présente invention, les oligonucléotides utilisés peuvent comprendre plusieurs séquences précédemment décrites adjacentes ou non, ils
35 peuvent comprendre également d'autres séquences biologiquement actives, comme des séquences antisens. Les

séquences hexamériques ou octamériques peuvent elles-mêmes être incluses dans des séquences antisens.

Les oligonucléotides stabilisés peuvent être utilisés, conformément à l'invention, comme principe actif
5 antitumoral à action locale.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des oligonucléotides stabilisés comme principe actif antitumoral à action locale, pour la
10 préparation de médicaments aptes à être utilisés dans le traitement des cancers, quels que soient leur nature et leur degré d'anaplasie, en particulier les cancers des systèmes nerveux central et périphérique, notamment les astrocytomes, les glioblastomes, les médulloblastomes, les neuroblastomes, les mélanomes et les carcinomes.

15 Les oligonucléotides stabilisés, utilisés conformément à l'invention, peuvent être couplés par des liaisons covalentes, ioniques ou faibles à une molécule susceptible d'augmenter l'affinité tumorale, comme par exemple un anticorps spécifique du tissu tumoral.

20 Les oligonucléotides stabilisés sont utilisés préférentiellement par voie intra-tumorale, mais ils peuvent être administrés également par toutes autres voies, éventuellement par voies multiples, notamment par voies intraveineuse, intrapéritonéale, topique,
25 transdermique, sous-cutanée, intra-artérielle, pulmonaire, naso-pharyngée ou orale, en solutions, en suspensions aqueuses ou huileuses, en poudre ou sous toute forme pharmaceutiquement acceptable.

Ils peuvent être administrés en une ou
30 plusieurs fois ou en libération continue, notamment au moyen de micropompes osmotiques, ou associés à tout moyen physique ou chimique, notamment à des agents encapsulants comme les systèmes de dispersion colloïdaux et les polymères, les administrations permettant d'avoir une
35 dose thérapeutiquement efficace au site tumoral.

Les doses efficaces seront déterminées en fonction de l'âge, de l'état de santé, du poids du patient et du type de cancer à traiter. Typiquement, les doses efficaces chez l'homme sont telles qu'au site
5 tumoral, les doses sont comprises entre 10 et 1000 µg/g de tumeur.

Conformément à l'invention, l'utilisation des oligonucléotides peut être combinée avec d'autres thérapies, notamment la chirurgie, la radiothérapie, la
10 chimiothérapie, l'immunothérapie et des thérapies différenciantes.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se
15 réfère aux exemples de réalisation de l'utilisation, objet de la présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels:

- la figure 1 illustre les résultats obtenus après une injection intra-tumorale de
20 l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), dans le modèle du gliome CNS1 dans le cerveau de rat Lewis (Kruse C. A. et al. (1994), *J. Neurooncol.* 22 pp 191-200), sur le temps de survie des animaux témoins (-) ; PT1 50µg injecté à J1 (-.-.-.), PT1 50µg injecté à J5 (....) et PT1 50µg
25 injecté à J9 (---), après l'injection des cellules tumorales. L'évaluation statistique des résultats est réalisée par le test de Kaplan-Meier.

- la figure 2 illustre l'effet d'une injection
30 intra-tumorale à J1 de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), à différentes doses, dans le modèle du gliome CNS1 du rat Lewis, sur le temps de survie des animaux témoins (-) ; PT1 50µg (----), PT1
35 10µg (-.-.-.) et PT1 1 µg (....).

- la figure 3 illustre l'effet d'une injection intra-tumorale de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), ou de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate IMM (SEQ ID N° 9 5'-TGACTGTGAAGGTTTCGAGATGA-3'), dans un modèle de tumeurs gliales sous-cutanées. A J2 après l'injection des cellules tumorales, les animaux reçoivent, par voie sous cutanée, au niveau du site tumoral, du chlorure de sodium (témoin -◆-), ou 50 µg de PT1 (-Δ-) ou 100 µg de PT1 (-●-) ou 50 µg d'IMM (-□-). Le volume de la tumeur est évalué tous les deux jours. Les résultats sont exprimés en moyenne ± s.e.m. (test anova).

- la figure 4 illustre l'effet d'une injection intra-tumorale de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate PT1 ou de l'oligodésoxynucléotide phosphodiester PE1 ayant tous les deux la SEQ ID N° 2 (5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), dans un modèle de tumeurs gliales sous-cutanées. A J2 après l'injection des cellules tumorales, les animaux reçoivent par voie sous cutanée, au niveau du site tumoral, du chlorure de sodium (témoin -◆-), ou 100 µg de PE1 (-□-) ou 100 µg de PT1 (-Δ-). Le volume de la tumeur est évalué tous les deux jours. Les résultats sont exprimés en moyenne ± s.e.m. (test anova).

- la figure 5 illustre l'effet d'une injection intra-tumorale de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), ou de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate IMM (SEQ ID N° 9 5'-TGACTGTGAAGGTTTCGAGATGA-3'), dans le modèle du neuroblastome neuro2a chez la souris A/J (Sigal R. K. et al. (1991), *J. Pediatr. Surg.* 26 pp 389-96). A J2 après l'injection de ces cellules tumorales, les animaux reçoivent, par voie sous cutanée au niveau du site tumoral, du chlorure de sodium (témoin -◆-), 50 µg de PT1

(-■-), 100 µg de PT1 (-▲-) ou 50 µg d'IMM (-□-). Le volume de la tumeur est évalué tous les quatre jours. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm s.e.m. (test-t de Student).

5 - la figure 6 illustre l'effet d'une injection par voie sous-cutanée ou par voie intrapéritonéale de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), à la dose de 50 µg dans le modèle du neuroblastome neuro2a chez la souris A/J (Sigal
10 R.K. et al. (1991), *J. Pediatr. Surg.* 26 pp 389-96). A J2 après l'injection de ces cellules tumorales, les animaux (n=6 par groupe) reçoivent 100 µl de chlorure de sodium (groupe témoin -◆-) ou 50 µg de PT1 injectés par voie i.p. (-■-) ou par voie s.c. à distance de la tumeur (-▲-) dans 100 µl de chlorure de sodium.

Les exemples qui suivent illustrent l'invention, sans toutefois la limiter à ces modes de réalisation particuliers.

20 **Exemple 1 : Effet d'une injection intra-tumorale ou d'une injection intrapéritonéale de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') sur la survie des animaux dans le modèle du gliome CNS1 dans le cerveau de rat Lewis**

25 1. Mode opératoire :

Des cellules de gliome CNS1 cultivées *in vitro* sont greffées dans le cerveau de rat Lewis sains, à raison de 10^5 cellules dans le cortex pariétal droit de rats (Kruse C. A. et al. (1994), *J. Neurooncol*, 22 pp 191-200).

30 a) injection intra-tumorale :

50 µg de PT1 dans 7 µl de chlorure de sodium sont injectés au niveau du site tumoral à 1, 5 et 9 jours après la greffe (groupe traité à J1, n=6 ; groupe traité à J5, n=8 ; groupe traité à J9, n=4) ; un groupe témoin
35 (n=14) reçoit du chlorure de sodium.

b) injection intrapéritonéale :

50 μ g de PT1 sont injectés par voie intrapéritonéale, à J1 (n = 5) ; un groupe témoin reçoit du chlorure de sodium (n = 5).

2. Résultats :

5 a) injection intra-tumorale :

Ils sont illustrés dans la figure 1.

Le groupe témoin montre une survie moyenne de 15 jours et tous les animaux meurent avant le 23ème jour.

La survie des animaux traités par PT1 est très
10 augmentée avec des survies à long terme (>90 jours) de 67% (p<0,01), de 88% (p<0,002) et de 50% (p<0,02) pour les rats traités à J1, J5 et J9 respectivement.

Tous les animaux morts présentent des tumeurs cérébrales à l'autopsie.

15 Chez les rats survivants, aucun ne présente de signes neurologiques et aucune tumeur n'est trouvée à l'autopsie pratiquée à J90.

b) injection intrapéritonéale :

Dans ces conditions le PT1 n'a pas d'effet
20 significatif.

**Exemple 2 : Effet d'une injection intra-tumorale de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') à différentes doses sur la survie des animaux dans le modèle du gliome
25 CNS1 du rat Lewis**

1. Mode opératoire :

Les rats reçoivent à J1 après la greffe réalisée dans les conditions décrites à l'exemple 1, une injection intra-tumorale de 1 μ g, 10 μ g ou 50 μ g de PT1
30 dissous dans 7 μ l de chlorure de sodium ou le véhicule seul (n=5 par groupe).

2. Résultats :

Ils sont illustrés dans la figure 2.

Une survie supérieure à 90 jours est obtenue
35 dans 60% des cas (p<0,01) après une injection unique de

50 μg , et dans 20% des cas (non significatif) après une dose de 10 μg .

Il n'y a aucun survivant après une dose de 1 μg (n=5).

5 Tous les rats témoins sont morts.

Chez les rats survivants, aucun ne présente de signes neurologiques et aucune tumeur n'est trouvée à l'autopsie pratiquée à J90.

10 **Exemple 3 : Etude de la mémoire immunitaire à 3 mois dans le modèle du gliome CNS1 du rat Lewis après injection de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3')**

1. Mode opératoire :

15 Chez des rats (n=5), traités à J5 après la greffe, par 50 μg de PT1 et ayant survécu grâce ce traitement au PT1, une nouvelle greffe de 10^6 cellules est pratiquée sur un autre site du cortex cérébral dans les conditions décrites à l'exemple 1, 12 jours après la fin du traitement initial.

20 Parallèlement, une greffe de 10^5 cellules est réalisée chez des rats non traités auparavant.

2. Résultats :

A 90 jours tous les animaux préalablement traités au PT1 ont survécu sans traitement supplémentaire.

25 L'analyse histologique montre qu'il n'y a aucune tumeur résiduelle tant pour le premier site d'implantation des cellules tumorales que pour le second site.

Tous les animaux témoins sont morts.

30

Exemple 4 : Comparaison des effets d'une injection intra-tumorale de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') sur la survie des animaux dans le modèle du gliome CNS1 du rat Lewis avec celle

d'un oligodésoxynucléotide (IMM) comprenant une séquence non immunostimulante octanucléotidique (SEQ ID N° 9 5'-TGACTGTGAAGGTTTCGAGATGA -3')

1. Mode opératoire :

5 Les rats reçoivent à J1 après la greffe réalisée dans les conditions décrites à l'exemple 1, une injection intra-tumorale de 50 µg de IMM dissous dans 7 µl de chlorure de sodium ou le véhicule seul (n=5 par groupe).

10 2. Résultats :

La durée de vie entre le groupe témoin, ayant reçu le chlorure de sodium, et le groupe traité, ayant reçu l'IMM n'est pas statistiquement différente.

15 Ainsi, un oligonucléotide ne comportant pas de séquence immunostimulante ne permet pas d'augmenter la survie, à l'inverse d'un oligonucléotide comportant une telle séquence (voir exemples 1 et 2).

Exemple 5 : Effet d'une injection intra-tumorale de PT1
20 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') ou d'un oligodésoxynucléotide (IMM) comprenant une séquence non immunostimulante octanucléotidique (SEQ ID N° 9 5'-TGACTGTGAAGGTTTCGAGATGA -3') dans un modèle de tumeurs gliales sous-cutanées.

25 1. Mode opératoire :

Des cellules de gliome CNS1 cultivées in vitro, sont injectées par voie sous-cutanée à des rats Lewis sains, à raison de 2×10^6 cellules dans le flanc droit (Kruse C. A. et al. (1994), J. Neurooncol. 22 pp
30 191-200).

Ce modèle permet de suivre avec plus de précision la croissance de la tumeur, qui peut être aisément évaluée tous les jours chez l'animal vivant. Dans ce modèle 100% des animaux injectés développent une tumeur
35 qui croît pendant au moins 2 semaines.

Ensuite, à J2 après l'injection des cellules tumorales, 50 μg ou 100 μg de PT1 ou 50 μg d'IMM, dans 100 μl de chlorure de sodium, sont injectés au niveau du site tumoral (groupe traité par 50 μg de PT1, $n=9$; groupe
 5 traité par 100 μg de PT1, $n=6$; groupe traité par 50 μg d'IMM, $n=9$) ; un groupe témoin ($n=9$) reçoit 100 μl de chlorure de sodium.

La croissance tumorale est mesurée tous les deux jours, et le volume tumoral est estimé au moyen de la
 10 formule :

$$\text{Vol} = (\text{longueur} \times \text{largeur} \times \text{largeur} \times \pi) / 6.$$

Les animaux sont sacrifiés à J12 après l'injection des cellules tumorales.

2. Résultats.:

15 Ils sont illustrés dans la figure 3.

Dans le groupe témoin, 9 animaux sur 9 ont développé une tumeur, avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 900 mm^3 .

20 Dans le groupe traité par l'IMM, 9 animaux sur 9 ont développé une tumeur, avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 1100 mm^3 .

Dans le groupe traité par PT1 50 μg , 7 animaux sur 9 ont développé une tumeur, avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 400 mm^3 , alors que dans le groupe
 25 traité par PT1 100 μg , seulement 3 animaux sur 6 ont développé une tumeur, avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 200 mm^3 .

L'ensemble de ces résultats confirme donc que le PT1 a un effet antitumoral marqué, lié à la présence
 30 d'une séquence immunostimulante.

Cet effet est dose-dépendant.

Exemple 6: Effet d'une injection intra-tumorale de PT1 (oligodésoxynucléotide phosphorothioate) ou de PE1
 35 (oligodésoxynucléotide non stabilisé) dans un modèle de

tumeurs gliales sous-cutanées ; PT1 et PE1 ayant tous les deux la même séquence immunostimulante (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3')

1. Mode opératoire :

5 Des cellules de gliome CNS1 cultivées *in vitro*, sont injectées par voie sous-cutanée à des rats Lewis sains, à raison de 2×10^6 cellules dans le flanc droit, dans les conditions décrites à l'exemple 5.

10 Ensuite, à J2 après l'injection des cellules tumorales, 100 μ g de PT1 ou 100 μ g de PE1 sont injectés au niveau du site tumoral (groupe traité par 100 μ g de PT1 dans 100 μ l de chlorure de sodium, n=6 ; groupe traité par 100 μ g de PE1 dans 100 μ l de chlorure de sodium, n=6) ; un groupe témoin (n=6) reçoit 100 μ l de chlorure de sodium.

15 La croissance tumorale est mesurée tous les deux jours, et le volume tumoral comme il est décrit dans l'exemple 5.

Les animaux sont sacrifiés à J12 après l'injection des cellules tumorales.

20 2. Résultats :

Ils sont illustrés dans la figure 4.

Dans le groupe témoin, 6 animaux sur 6 ont développé une tumeur avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 1200 mm³.

25 Dans le groupe traité par PE1, 6 animaux sur 6 ont développé une tumeur, avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 1000 mm³.

30 Dans le groupe traité par PT1 100 μ g, seulement 3 animaux sur 6 ont développé une tumeur, avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 200 mm³.

Exemple 7 : Recherche du mécanisme des effets du PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), *in vitro* et *in vivo* sur les cellules du gliome CNS1

35 1. Mode opératoire :

a) *in vitro* :

A J0, on met des cellules de gliome CNS1 en culture. A J1, on ajoute à ces cellules PT1 à des concentrations de 0,05 μ M, 0,5 μ M et de 5 μ M et à J3 on traite les cellules par de la trypsine et on mesure leur viabilité.

b) *in vivo* : voir le mode opératoire de l'exemple 1.

2. Résultats :a) *in vitro*

PT1, à des concentrations de 0,05 μ M, 0,5 μ M et de 5 μ M ne possède pas d'action cytotoxique directe sur les cellules CNS1 après 48 heures de culture.

b) *in vivo*

En revanche, les études immunohistochimiques montrent que l'injection de 50 μ g de PT1 au sein de la tumeur, déclenche une infiltration massive de cellules NK, de macrophages et de cellules microgliales alors que l'injection de chlorure de sodium est sans effet.

Ces résultats suggèrent que l'action du PT1 est due à une activation du système immunitaire local.

Exemple 8 : Effet d'une injection intra-tumorale de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') et d'IMM (SEQ ID N° 9 5'-TGACTGTGAAGGTTTCGAGATGA-3') dans le modèle du neuroblastome neuro2a chez la souris A/J

1. Mode opératoire :

La tumeur est obtenue par injection d'un million de cellules neuro2a dans le flanc droit de souris A/J (Sigal R. K. et al. (1991), *J. Pediatr. Surg.*, 26 pp 389-96). Cette tumeur grossit en 15-20 jours, aboutissant généralement au décès de l'animal ou obligeant à son sacrifice.

A J2 après l'injection de ces cellules tumorales, 50 μ g ou 100 μ g de PT1 ou 50 μ g d'IMM dans 100 μ l de chlorure de sodium ou 100 μ l de chlorure de

sodium (groupe témoin) sont injectés au même endroit (n=6 animaux par groupe).

La croissance tumorale est mesurée tous les quatre jours et le volume tumoral est mesuré comme indiqué dans l'exemple 5.

Les animaux sont sacrifiés à J22 après l'injection des cellules tumorales.

2. Résultats :

Ils sont illustrés dans la figure 5.

Dans ce modèle, le volume moyen de la tumeur à J22 est d'environ 800 mm³ dans le groupe témoin, d'environ 1200 mm³ dans le groupe traité par 50 µg d'IMM, d'environ 200 mm³ dans les groupes traités par 50 µg ou 100 µg de PT1.

Exemple 9 : Effet d'une injection par voie sous-cutanée ou par voie intrapéritonéale de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') à la dose de 50 µg dans le modèle du neuroblastome neuro2a chez la souris A/J

1. Mode opératoire :

La tumeur est obtenue selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 8.

A J2 après l'injection des cellules tumorales, 50 µg de PT1 dans 100 µl de chlorure de sodium ou 100 µl de chlorure de sodium (groupe témoin) sont injectés soit par voie sous-cutanée à distance de la tumeur, soit par voie intrapéritonéale (n=6 animaux par groupe).

La croissance tumorale est mesurée tous les quatre jours et le volume tumoral est mesuré comme indiqué dans l'exemple 5.

Les animaux sont sacrifiés à J22 après l'injection des cellules tumorales.

2. Résultats :

Ils sont illustrés dans la figure 6.

Dans ce modèle, le volume moyen de la tumeur à J22 est d'environ 1000 mm³ dans le groupe témoin, d'environ 400 mm³ dans le groupe traité par 50 µg de PT1 injecté par voie sous-cutané et d'environ 500 mm³ dans le
 5 groupe traité par 50 µg de PT1 injecté par voie intrapéritonéale.

Exemple 10 : Effet d'une injection répétée par voie sous-cutanée de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3')
 10 ou d'IMM (SEQ ID N° 9 5'-TGACTGTGAAGGTTTCGAGATGA-3') à la dose de 10 µg pendant 15 jours dans le modèle du neuroblastome neuro2a chez la souris A/J

1. Mode opératoire :

La tumeur est obtenue selon le mode opératoire
 15 décrit dans l'exemple 8.

La croissance tumorale est mesurée régulièrement chez tous les animaux et lorsque le diamètre de la tumeur atteint 5 mm, PT1 est injecté, par voie sous-cutanée, autour de la tumeur, pendant 15 jours, à la
 20 dose de 10 µg par jour dans 100 µl de chlorure de sodium (groupe traité par PT1, n=7) ou IMM est injecté par voie sous-cutanée autour de la tumeur pendant 15 jours à la dose de 10 µg par jour dans 100 µl de chlorure de sodium (groupe traité par IMM, n=4) ou 100 µl de chlorure de
 25 sodium est injecté par voie sous-cutanée autour de la tumeur pendant 15 jours (groupe témoin, n=6).

2. Résultats :

Dans le groupe témoin et dans le groupe traité par l'IMM, la croissance tumorale n'est pas ralentie et
 30 tous les animaux de ces deux groupes meurent de leur tumeur.

Dans le groupe traité par PT1, la disparition complète de la tumeur, sans récédive à long terme, est observée chez 3 souris ; chez 3 autres les tumeurs se
 35 stabilisent pendant 3 semaines mais reprennent ensuite leur progression jusqu'aux décès des animaux.

Ces résultats montrent que les oligonucléotides immunostimulants stabilisés utilisés selon l'invention, possèdent un effet anti-tumoral intrinsèque marqué, lié à la présence de la séquence
5 immunostimulante et à leur stabilisation.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés qui comprennent au moins une séquence hexamérique de type, 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3' pour la
5 préparation d'un médicament à action antitumorale locale.

2. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés qui comprennent au moins une séquence octamérique du type 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-CG-3' ou 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-CC-3' comme
10 principe actif antitumoral à action locale.

3. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon la revendication 1 caractérisée en ce que lesdits oligonucléotides comprennent au moins une séquence hexamérique choisie dans le groupe constitué par AACGTT,
15 GACGTT, AGCGTT, GGCGTT, AACGTC, GACGTC, GACGTC, AGCGTC, GGCGTC.

4. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon la revendication 2 caractérisée en ce que ledits oligonucléotides comprennent au moins une séquence choisie
20 dans le groupe constitué par : AACGTTCC, GACGTTCC, AGCGTTCC, GGCGTTCC, AACGTTCCG, GACGTTCCG, AGCGTTCCG, GGCGTTCCG, AACGTTCCC, GACGTTCCC, AGCGTTCCC, GGCGTTCCC, AACGTTCCG, GACGTTCCG, AGCGTTCCG, GGCGTTCCG.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'oligonucléotide est choisi dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 6.
25

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que au moins une cytosine de la séquence hexamérique ou octamérique est remplacée par une cytosine modifiée.
30

7. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que les oligonucléotides stabilisés
35 sont sélectionnés dans le groupe constitué par les phosphorothioates, les méthylphosphonates et les

oligonucléotides dont au moins une extrémité a été stabilisée.

8. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que les oligonucléotides sont sous forme de simple brin ou de double brin.

9. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que les oligonucléotides sont couplés par des liaisons covalentes, ioniques ou faibles à une molécule susceptible d'augmenter l'affinité tumorale.

10. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, comme principe actif antitumoral pour la préparation d'un médicament utile pour traiter les cancers quels que soient leur nature et leur degré d'anaplasie.

11. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon la revendication 10, caractérisée en ce que le cancer est choisi dans le groupe constitué par les cancers des systèmes nerveux central et périphérique.

12. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon la revendication 11, caractérisée en ce que le cancer est choisi dans le groupe constitué par les astrocytomes, les glioblastomes, les médulloblastomes, les neuroblastomes, les mélanomes et les carcinomes.

13. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisée en ce que le médicament est administré de manière à avoir une dose au niveau du site tumoral de 10 à 1000 µg/g de tumeur.

14. Utilisation des oligonucléotides stabilisés selon la revendication 13 caractérisée en ce que le médicament est administré par voie intratumorale.

15. Utilisation des oligonucléotides stabilisés selon la revendication 13, caractérisée en ce que le médicament est administré par une voie choisie

dans le groupe constitué par les voies intraveineuse, intrapéritonéale, topique, transdermique, sous-cutanée, intra-artérielle, pulmonaire, naso-pharyngée ou orale.

5 16. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 10 à 15, caractérisée en ce que les oligonucléotides stabilisés utilisés sont associés à tout moyen physique ou chimique facilitant l'obtention d'une dose locale efficace.

10 17. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 10 à 16, caractérisée en ce que les oligonucléotides sont administrés sous toute forme pharmaceutiquement acceptable.

LISTAGE DE SEQUENCE

<110> ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS
 UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI)
 5 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE

 <120> UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES STABILISES COMME
 PRINCIPE ACTIF ANTITUMORAL

 10 <130> CMGrml020/8FR

 <140>
 <141>

 15 <160> 6

 <170> PatentIn Vers. 2.0

 <210> 1
 20 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 25 <223> OLIGONUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATE

 <220>
 <223> OLIGONUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATE

 30 <400> 1
 tgaccgtgaa cgttcgagat ga 22

 <210> 2
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATE

5 <400> 2

tgactgtgaa cgttcgagat ga

22

<210> 3

<211> 23

10 <212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATE

15

<400> 3

tcatctcgaa cgttccacag tca

23

<210> 4

20 <211> 22

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

25 <223> OLIGONUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATE

<400> 4

tgactgtgaa cgttccagat ga

22

30 <210> 5

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

35 <220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATE

<400> 5

tccataacgt tgcctaacg ttcgtc

26

5 <210> 6

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

10 <220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE PHOSPHOROTHIOATE

<400> 6

tgccagtgac gtcatgtgac

20

15

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés qui comprennent au moins une séquence hexamérique de type,

5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3' pour la
5 préparation d'un médicament à action antitumorale locale.

2. Oligonucléotides stabilisés qui comprennent au moins une séquence octamérique du type

5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-CG-3' ou

5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-CC-3' comme
10 principe actif antitumoral à action locale.

3. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon la revendication 1 caractérisée en ce que lesdits oligonucléotides comprennent au moins une séquence hexamérique choisie dans le groupe constitué par AACGTT,
15 GACGTT, AGCGTT, GGCGTT, AACGTC, GACGTC, GACGTC, AGCGTC, GGCGTC.

4. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon la revendication 2 caractérisée en ce que ledits oligonucléotides comprennent au moins une séquence choisie
20 dans le groupe constitué par : AACGTTCC, GACGTTCC, AGCGTTCC, GGCGTTCC, AACGTTTCG, GACGTTTCG, AGCGTTTCG, GGCGTTTCG, AACGTCCC, GACGTCCC, AGCGTCCC, GGCGTCCC, AACGTTTCG, GACGTTTCG, AGCGTTTCG, GGCGTTTCG.

5. Utilisation selon l'une quelconque des
25 revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'oligonucléotide est choisi dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 6.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que au moins une
30 cytosine de la séquence hexamérique ou octamérique est remplacée par une cytosine modifiée.

7. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que les oligonucléotides stabilisés
35 sont sélectionnés dans le groupe constitué par les phosphorothioates, les méthylphosphonates et les

Figure 1

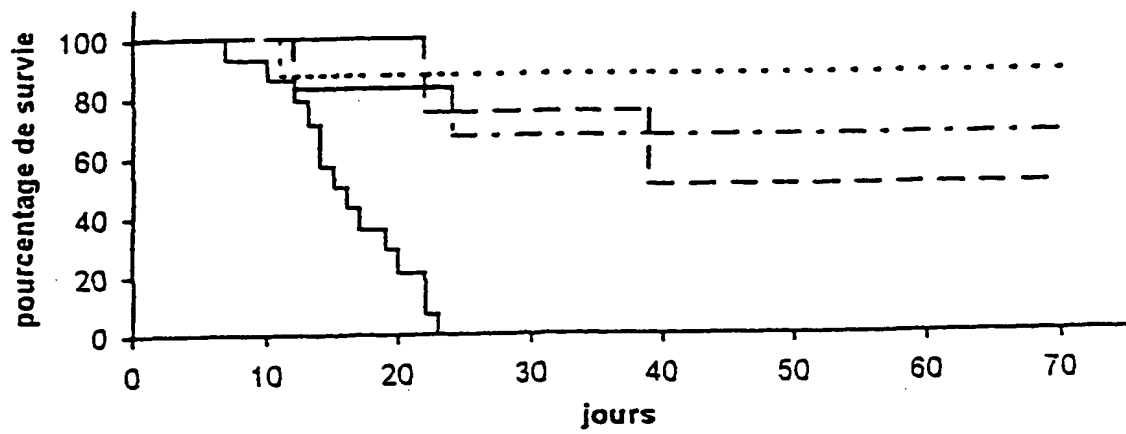


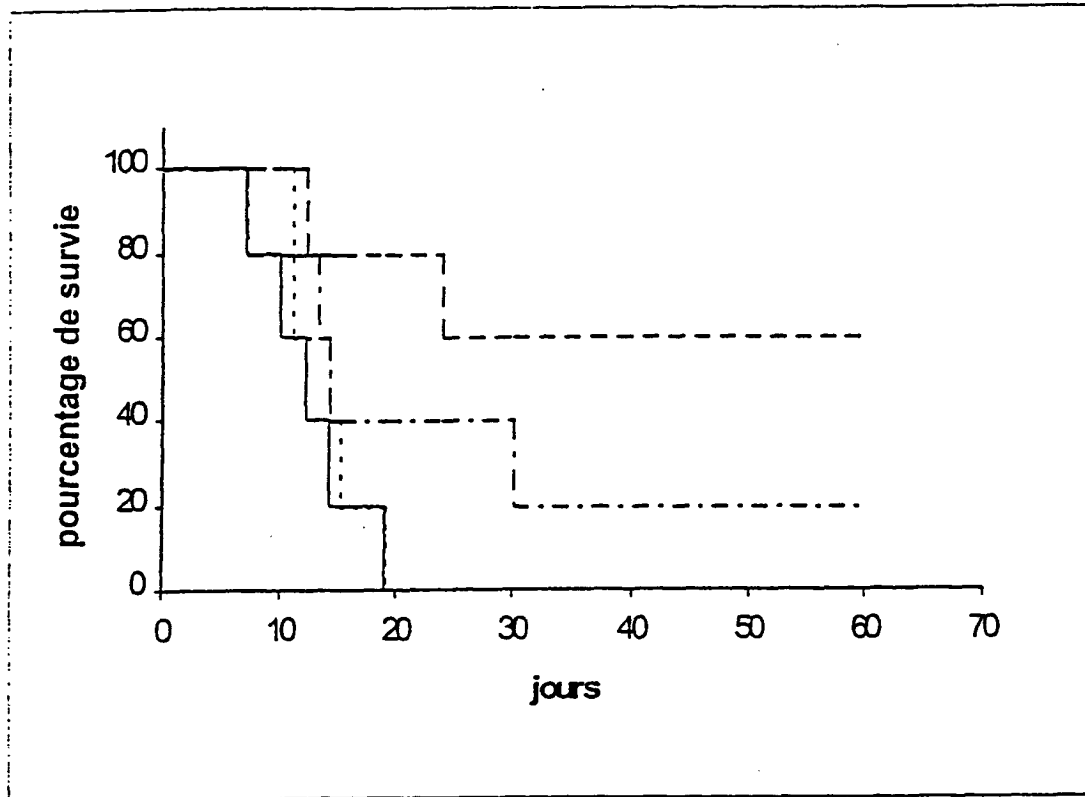
FIGURE 2

Figure 3

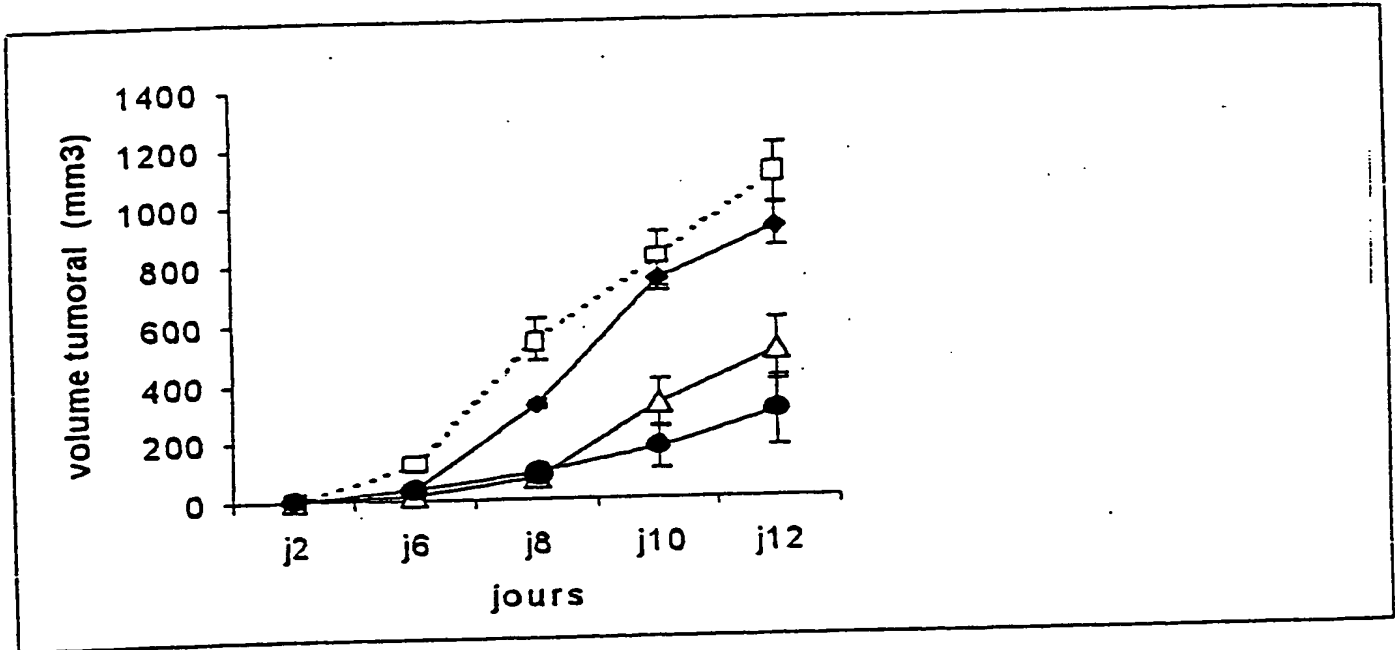


FIGURE 1.

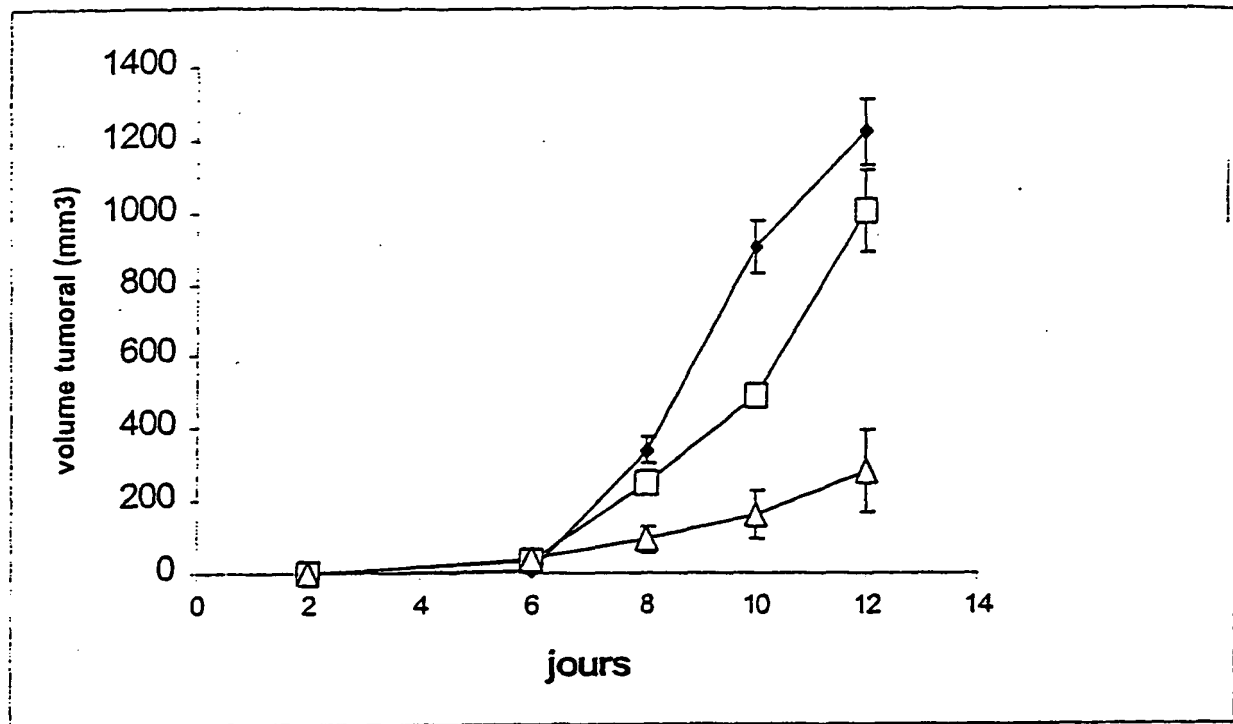


FIGURE 5

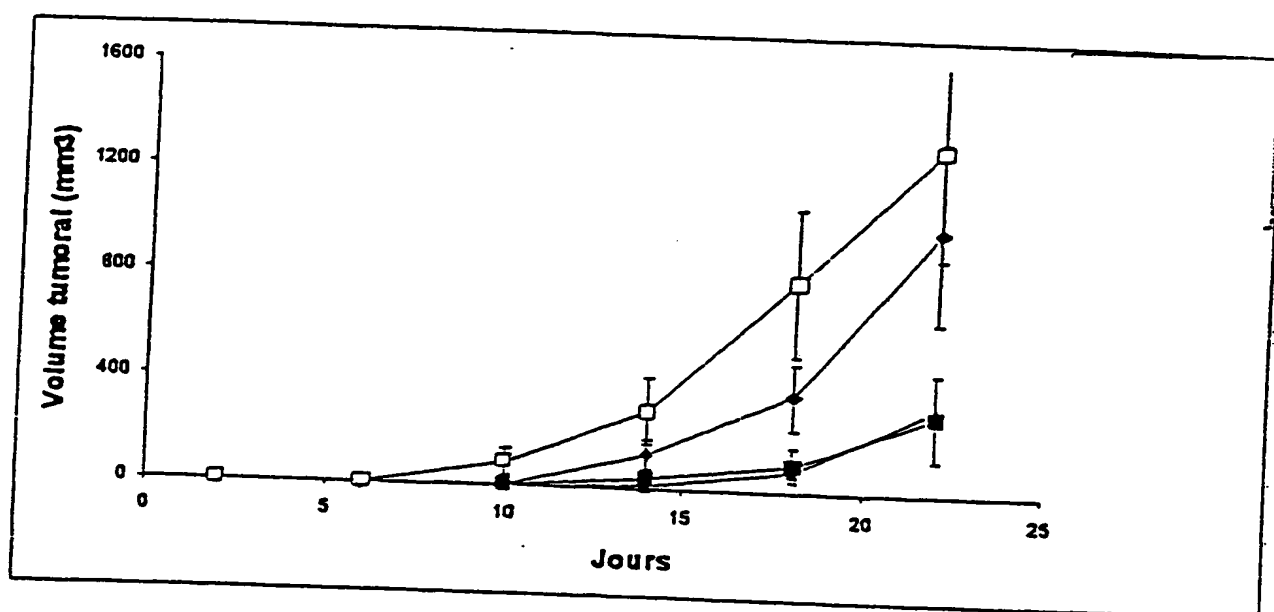


FIGURE 6

